Münster 1936 No 362 Med DiSS

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.)

Körpereigene Wirkstoffe und Pankreatinverdauung. Versuche mit Gelatine, Casein und Muskelgewebe.

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
WESTFÄLISCHEN WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU
———— MÜNSTER (WESTF.) ————

vorgelegt von

Hans Adolf Wentz
aus Minden i. W.

1936

Gedruckt in der Dissertationsdruckerei von Robert Kleinert in Quakenbrück.

Dekan: Professor Dr. K. W. Jötten.
Referent: Dozent Dr. med. et phil. W. Haarmann.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Westf.).

I. Einleitung.

Im Rahmen von Untersuchungen über das Auftreten von pharmakologisch wirksamen Stoffen unter der Einwirkung von Verdauungsfermenten auf Proteide und Proteine war in einer Versuchsreihe festzustellen, ob unter der Einwirkung von Pankreatin aus höheren Eiweißstoffen pharmakologisch wirksame Substanzen entstehen und welcher Art diese, falls sie vorkommen, sind.

Andererseits war festzustellen, ob die in der Gelatine[1]), dem Casein[2]) und Muskelgewebe nachgewiesenen cholin- und adenosinartigen Wirkstoffe unter dem Einfluß des Pankreatins verändert oder zerstört werden.

Die Versuche wurden angestellt mit Gelatine, Casein und Muskelgewebe, parallel mit Untersuchungen von Nolten über den Einfluß der Pankreatinverdauung von Fibrin, Serum und Lebergewebe auf Bildung und Veränderung körpereigener Wirkstoffe. In die gleiche Reihe gehören Arbeiten über Pepsineinwirkung von Dortmann[3]), über Trypsineinwirkung von Krumfuß[4]) und Surmann[5]) und über Papaineinwirkung von Grochowiak[6]).

Als Pankreatin wurde das handelsübliche Präparat, ein mit Alkohol gefällter Pankreasextrakt, der eiweiß-, stärke- und fettspaltende Fermente enthält, verwendet. An eiweißspaltenden Fermenten enthält das Pankreatin verschiedene Proteasen, die zusammen als Ganzes in Aufeinanderfolge wirkend imstande sind, Proteide und Proteine bei schwach alkalischer Reaktion bis zu den kleinsten Eiweißbausteinen zu zerlegen.

Nach Verdauung der Gelatine, des Caseins und des Muskelgewebes durch das Pankreatin im Brutschrank wurden wässerige und alkoholische Extrakte hergestellt, die pharmakologisch geprüft wurden.

---

[1]) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).
[2]) A. Wenzel, Inaug.-Diss. Münster 1932.
[3]) Th. Dortmann, Inaug.-Diss., Münster 1935.
[4]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.
[5]) Surmann, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).
[6]) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).

Bei der angewandten Versuchsanordnung wurden nur die dabei entstehenden oder bereits vorhandenen niedrig-molekularen Stoffe erfaßt, höher-molekulare wurden durch Enteiweißung und Dialyse ausgeschieden.

Besondere Beachtung wurde der Frage des Auftretens histaminähnlicher Stoffe geschenkt, deren Resorption von praktischer Bedeutung für den Körper bei normaler Verdauung und noch mehr bei deren pathologischen Veränderungen ist. Dabei war bekannt, daß die so wirksamen Amine wohl ausschließlich durch bakterielle Einwirkung entstehen. Denkbar war aber auch, daß im großen Molekül eingebaut unwirksame Substanzen bei dessen Abbau frei werden. Die vorwiegend entstehenden Aminosäuren haben als pharmakologisch unwirksam zu gelten.

II. Methodik.

Die verwendete Gelatine war die Mercksche Gelatina alba. Als Caseinpräparat wurde das nach Hamarsten hergestellte Präparat zur Anwendung gebracht. Das Muskelgewebe stammte vom Kaninchen und wurde lebensfrisch verarbeitet.

Die wässerigen Extrakte wurden als „Dialysate“ oder Trichloressigsäureextrakte gewonnen. Bei ersteren wurden die verdauten Ansätze in Dialysierhülsen nach Schleicher-Schüll gefüllt und unter Wechseln der Flüssigkeit 48 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert. Die Dialysate wurden vereinigt, neutralisiert und bei 40° bis 50° C im Vakuum zur Trockene eingeengt. Nach Lösen des Rückstandes in Aqua dest. wurde das „Dialysat“ auf seine pharmakologische Wirksamkeit untersucht.

Die Aufarbeitung zum Trichloressigsäureextrakt wurde eingeleitet durch Zusatz von fester Trichloressigsäure zum verdauten Gemisch. Nach Abtrennen des gefällten unverdauten Eiweißrestes wurde das Filtrat durch kontinuierliche Aetherextraktion im modifizierten Soxlethapparat von der überschüssigen Trichloressigsäure befreit, neutralisiert und im Vakuum bei 40—50° C zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in Aqua dest. gelöst und als „Tr.-Filtrat“ pharmakologisch geprüft.

Die alkoholischen Extrakte wurden nach dem Verfahren von Best, Dale, Dudley und Thorpe[7]) hergestellt. Dieses Verfahren soll vor allem zum Nachweis histaminähnlicher Stoffe geeignet sein. Nach Zipf[8])

[7]) C. H. Best, H. H. Dale, H. W. Dudley und W. V. Thorpe, Journ. of physiol. 62, 397 (1927).

[8]) K. Zipf, Arch. exp. Pathol. 160, 579 (1931).

werden dadurch auch adenosinartige Stoffe erfaßt. Das verdaute Gemisch wurde mit der doppelten Menge 96proz. Alkohol versetzt und nach 24stündigem Stehen im Eisschrank filtriert. Das Filtrat wurde durch Zusatz von 4 cm³ 20proz. Schwefelsäure auf 1000 cm³ Filtrat angesäuert und nach 24stündigem Stehen im Eisschrank erneut filtriert. Nach Neutralisation wurde im Vakuum bei 40—50 ° C auf ein möglichst kleines Volumen eingeengt. Durch Zusatz von absolutem Alkohol wurde aus der wässerigen Lösung eine 80proz. alkoholische bereitet, aus der durch Zusatz von drei Volumteilen Aceton die wirksamen Substanzen gefällt wurden. Nach 24stündigem Aufenthalt im Eisschrank Abtrennen der überstehenden Flüssigkeit. Anschließend wurde die „Acetonfällung" bei gelinder Wärme getrocknet und in möglichst wenig Aqua dest. gelöst. Die wässerige Lösung wurde in zwei gleiche Teile geteilt, von denen der eine mit Salzsäure (3—4 %) zwei Stunden im siedenden Wasserbade hydrolisiert und nach Neutralisation auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt wurde. Der andere Teil wurde nach dem Salzsäurezusatz gleich neutralisiert, so daß eine Hydrolyse nicht eintrat.

Die pharmakologische Untersuchung von „Dialysat", „Tr.-Filtrat" und „Acetonfällung" wurde am Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose und am isolierten Kaninchendünndarm durchgeführt.

Bei dieser Versuchsanordnung können histaminähnliche in diesem Falle blutdrucksteigernde Substanzen von den depressorischen Stoffen unterschieden werden. Die Trennung der adenosinartigen von den cholinähnlichen Stoffen ist möglich durch Atropinisierung vor der Extraktanwendung. Dabei fallen die cholinähnlichen Stoffe als atropinempfindlich aus.

Bei der biologischen Prüfung am Darm wirken Histamin und Cholin erregend, dagegen Adenosin hemmend, wobei wieder die vorherige Atropinanwendung die cholinähnlichen Stoffe in ihrer Wirkung unterdrückt.

Bei Anwendung beider pharmakologischer Testverfahren bin ich also imstande festzustellen, mit welchen der bekannten pharmakologisch depressorisch wirksamen Abbaustoffen die entstandenen oder präformiert vorhandenen Wirkstoffe Aehnlichkeit besitzen.

III. Versuche mit Gelatine.

Die Ergebnisse der Gelatine-Pankreatinversuche decken sich vollständig mit denen von Grochowiak[9]) und Krumfuß[10]), welche den Ein-

[9]) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).
[10]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.

fluß von Papain bzw. von Trypsin auf Gelatine untersuchten. Der Ansatz bestand aus 200 cm³ 5proz. Gelatinelösung, der 0,5 g Pankreatin, 2,5 g Natriumkarbonat und 4 cm³ Toluol zugesetzt wurden. Toluol diente zur Konservierung und Ausschaltung bakterieller störender Einflüsse. Das Gemisch wurde 70 Stunden bei 38° C bebrütet und anschließend in der oben beschriebenen Weise verarbeitet. Die angestellte Sulfosalizylprobe zeigte, daß das Tr.-Filtrat eiweißfrei war. Das „Tr.-Filtrat" wirkte am Blutdruck des Kaninchens in tiefer Aethernarkose depressorisch. Durch Atropin wurde diese Blutdrucksenkung nicht wesentlich beeinflußt. Der isolierte Kaninchendünndarm wurde durch das „Tr.-Filtrat" gehemmt. Auch hier war Atropin praktisch ohne Einfluß. Danach zeigte also das Trichloressigsäurefiltrat des verdauten Gelatine-Pankreat-Gemisches eine reine adenosinartige Wirkung.

Bei der „Acetonfällung" wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Außerdem waren aber auch noch cholinartige Stoffe in der „Acetonfällung" deutlich erkennbar. Der Blutdruck wurde durch die „Acetonfällung ebenfalls gesenkt. Aber hier war zu beobachten, daß die Senkung bei Atropineinwirkung schwächer war. Der Darm wurde hier gehemmt. Nach der mit der „Acetonfällung" vorgenommenen Hydrolyse war die hemmende Wirkung durch eine erregende ersetzt, die wiederum auf Atropin verschwand.

Histamin oder histaminähnliche Stoffe konnten, wie in den Versuchen von Grochowiak[11]) und Krumfuß[12]), auch hier nicht nachgewiesen werden.

Bisher unbekannte Stoffe traten unter der Einwirkung des Pankreatins nicht auf. Bei den gefundenen adenosinartigen und cholinähnlichen Stoffen handelt es sich, wie schon in der Einleitung angegeben, um die im Ausgangspräparat vorhandenen Wirkstoffe, deren Vorhandensein J. Grochowiak[13]) im unverdauten Trichloressigsäurefiltrat und in der Acetonfällung nachwies.

Aehnlich wie bei Krumfuß[14]), bei dem die präformierten Wirkstoffe durch Trypsineinwirkung nicht verändert wurden, wurden dieselben auch hier durch die Pankreatinverdauung nicht verändert. Durch die zweistündige Salzsäurehydrolyse wurden die adenosinartigen Stoffe in ihrer Wirkung zerstört, so daß die vorher überdeckte Wirkung der Cholinsubstanzen erkennbar wurde.

---

[11]) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).
[12]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.
[13]) J. Grochowiak, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).
[14]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.

IV. Versuche mit Casein.

Der Ansatz bei den Caseinversuchen bestand aus: 200 cm³ einer 5proz. Caseinlösung, 0,2 g Pankreatin, 0,2 g Natriumkarbonat und 4 cm³ Toluol.

Dieses alkalische Verdauungsgemisch wurde 50—60 Stunden bei 38° C bebrütet und zu Dialysat, „Tr.-Filtrat" und „Acetonfällung" in der oben angegebenen Weise verarbeitet.

Das „Dialysat" hatte nur eine geringe pharmakologische Wirkung. Der Blutdruck wurde leicht gesenkt. Atropin änderte an der Wirkung nichts. Der isolierte Darm wurde gehemmt. Vor allem bei kleineren Mengen ging manchmal dieser Hemmung eine Erregung voraus. Diese Erregung konnte durch Atropin unterdrückt werden. Die Wirkungen konnten nur auf das Vorhandensein adenosinartiger und cholinähnlicher Stoffe zurückgeführt werden.

Das „Tr.-Filtrat" zeigte die gleichen Wirkungen stärker und deutlicher. Die Blutdrucksenkung war teilweise durch Atropin hemmbar. Der Darm wurde erregt. Häufig folgte dabei einer starken Erregung eine deutliche Hemmung. Die erregende Wirkung konnte wieder mit Atropin aufgehoben werden. Dadurch trat dann oft eine bis dahin latente Hemmung hervor.

Auch bei der „Acetonfällung" sahen wir das gleiche Wirkungsbild, das durch adenosinartige und cholinähnliche Stoffe hervorgerufen wurde.

Nach Säurehydrolyse der „Acetonfällung" fielen die adenosinartigen Stoffe vollkommen oder teilweise weg; die Cholinsubstanzen wurden unwirksam.

Histamin oder histaminähnliche Substanzen wurden nicht gefunden. Neue Wirkstoffe traten nicht auf. Die Ergebnisse decken sich mit den von Dortmann[15] und Krumfuß[16]) gefundenen. Die Ergebnisse sind gut erklärbar durch die in der Milch vorhandenen präformierten adenosinartigen und cholinähnlichen Stoffe, die durch die Pankreatinverdauung, wie wir schon oben sahen, nicht zerstört werden.

V. Versuche mit Muskelgewebe.

Die Verdauungsansätze enthielten 50 g frisch zerkleinerte Kaninchenmuskulatur, die in 200 cm³ Aqua dest. aufgeschwemmt und mit 0,5 g Pankreatin und 0,5 g Natriumkarbonat versetzt wurden. Zur Unter-

---

[15]) Th. Dortmann, Inaug.-Diss., Münster 1935.

[16]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.

drückung der bakteriellen Verdauung wurden wieder 4 cm³ Toluol hinzugefügt. Nach einer Bebrütungsdauer von 46—53 Stunden bei 38° C wurde das alkalische Verdauungsgemisch nach Neutralisation in der üblichen oben angegebenen Weise zu „Tr.-Filtrat" und „Acetonfällung" verarbeitet. Eine Dialyse des Verdauungsgemisches wurde nicht vorgenommen. Bei den fertig verarbeiteten Substanzen zeigte die negative Sulfosalizylprobe das Fehlen von unverdautem Eiweiß an. Die angestellte Orzinprobe auf Pentosen sprach positiv an, was mit dem pharmakologisch nachgewiesenen Vorhandensein von adenosinartigen Stoffen gut übereinstimmte.

Das „Tr.-Filtrat" zeigte nahezu reine Adenosinwirkung: am atropinisierten Kaninchen in tiefer Aethernarkose deutliche Blutdrucksenkung. Am Darme trat als Ausdruck dieser fast reinen Adenosinwirkung eine starke Hemmung auf. Für die Gegenwart von geringen Mengen cholinähnlicher Stoffe sprach die nur geringe Abschwächung der blutdrucksenkenden Wirkung durch die vorhergegangene Atropinanwendung. Die in diesem Falle vorgenommene Prüfung am isolierten Meerschweinchenuterus ergab eine Erregung durch das „Tr.-Filtrat". Diese Wirkung wurde durch Atropin nicht aufgehoben.

Die „Acetonfällung" zeigte die gleiche depressorische Wirkung auf den Blutdruck am atropinisierten Kaninchen in tiefer Aethernarkose und am Darme Hemmung. Nach vorhergehender Säurehydrolyse trat am isolierten Darm reine Erregung auf, die durch Atropin aufgehoben werden konnte.

Damit war sowohl für die „Tr.-Filtrat" und „Acetonfällung" auch hier Adenosinwirkung und Cholinwirkung sichergestellt. Dabei überwog die Adenosinwirkung die Cholinwirkung, die wie im Gelatine-Pankreatinversuch erst nach der Hydrolyse bei der pharmakologischen Prüfung am Darm hervortrat.

Auch hier konnten weder Histamin noch histaminähnliche Substanzen oder andere unbekannte Wirkstoffe festgestellt werden.

Bei den festgestellten Wirkstoffen handelte es sich um die von Zipf[17]) im Trichloressigsäurefiltrat aus unverdautem Muskel nachgewiesenen Adenosin- und Cholinstoffe. Diese präformierten Wirkstoffe wurden auch hier wie in den Versuchen mit Gelatine und Casein durch die Pankreatinverdauung nicht verändert oder zerstört.

Das Ergebnis stimmt auch im Muskelversuche mit den Ergebnissen von Surmann[18]), Dortmann[19]) und Krumfuß[20]) überein.

---

[17]) K. Zipf, Arch. exp. Pathol. u. Pharm. 157, 97, 1930.

[18]) Surmann, Inaug.-Diss. Münster (in Vorbereitung).

[19]) Th. Dortmann, Inaug.-Diss., Münster 1935.

[20]) A. Krumfuß, Inaug.-Diss. Münster 1936.

VI. Zusammenfassung.

1. Bei der Pankreatinverdauung von Gelatine, Casein und frischem Muskelgewebe entstehen keine neuen Wirkstoffe.

2. Histamin und histaminähnliche Substanzen werden bei der Verdauung von Gelatine, Casein und frischem Muskelgewebe durch Pankreatinverdauung weder gebildet noch freigelegt. Präformiertes Histamin ist in Gelatine, Casein und frischem Muskelgewebe nicht in pharmakologisch nachweisbaren Mengen vorhanden.

3. Die in Gelatine, Casein und frischem Muskelgewebe präformiert vorkommenden adenosinartigen und cholinähnlichen Substanzen sind auch nach der Pankreatineinwirkung unverändert nachweisbar.

Lebenslauf.

Am 9. November 1909 wurde ich in Wildemann im Harz geboren. Nach dreijährigem Besuche der Volksschule trat ich Ostern 1919 in die Sexta des Gymnasiums zu Gütersloh ein. Ab Ostern 1924 besuchte ich die Bessel-Oberrealschule in Minden in Westfalen. Dort legte ich Ostern 1929 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich Medizin an den Universitäten Göttingen, Freiburg, Wien und Münster. Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Januar 1935 in Münster. Die Medizinalpraktikantenzeit erledigte ich in Niebüll in Schleswig und in Münster.

Hans-Adolf Wentz.